

Az elvégzett munka ismertetése és az elért eredmények összefoglalása:

Kísérleteink kezdeti szakaszában - az előzetes terveknek megfelelően - biolumineszcencia rezonancia energiaenergiatranszfer (BRET) módszer elvégzéséhez szükséges plazmidokat állítottunk elő. Első lépésben az AT1 angiotenzinreceptorok C-terminális részéhez sárga fluoreszcens fehérjét (YFP), illetve cián fluoreszcens fehérjét (CFP) kapcsoltunk. E fúziós fehérjéket endogén AT1-receptort nem tartalmazó, majomvese eredetű COS-7 tumorsejtekben, HEK 293-es humán vesetumor-sejtekben és kínai hörcsög ovarium (CHO) sejtekben expresszáltuk. Megállapítottuk, hogy a munkacsoportunkban korábban már használt AT1-receptor/zöld fluoreszcens fehérje (GFP) fúziós fehérjéhez hasonlóan ezek a receptorok is az eredeti AT1-receptoréhoz hasonló ligandkötési és jelátviteli tulajdonságokkal rendelkeznek. Fluoreszcens tulajdonságai alapján a YFP-vel összekapcsolt receptor konfokális mikroszkóppal élő sejtekben is megfigyelhető, és ott a GFP-vel jelzett receptorhoz hasonlóan helyezkedik el. A sejtek angiotenzin II-vel történő serkentését követően a receptor a sejtmembránból intracelluláris vezikulákba internalizálódik, melyek előbb a sejt periferiáján jelennek meg, majd később egy a sejtmag közelében található kompartmentben halmozódnak fel. Szintén létrehoztunk olyan fehérjéket, melyekben a β 2-arresztin molekulát piros fluoreszcens fehérjével (RFP), illetve renilla luciferázzal (RL) kapcsoltuk össze. A β 2-arresztin/RFP molekula kontroll sejtekben homogén eloszlásban a citoplazmában volt megtalálható. AT1-receptort expresszáló sejtek angiotenzin II-vel történő serkentését követően a β 2-arresztin/RFP molekula a sejtmembránhoz, illetve az AT1-receptort tartalmazó intracelluláris vezikulákba transzlokálódott. Tehát az aktivált receptor és a β 2-arresztin molekula között kapcsolat alakult ki, mely konfokális mikroszkóppal megfigyelhető volt. Ezt követően megvizsgáltuk e kapcsolat kialakulásának kinetikáját BRET módszerrel. Ennek során a sejtekben AT1-receptor/YFP-t és β 2-arresztin/RL-t expresszáltunk. Megállapítottuk, hogy megfelelő RL szubsztrát adását követően a kontroll sejtekben a két molekula között csak minimális mértékű (a háttértől érdemlegesen nem különböző) BRET jel jön létre. Angiotenzin II hatására dózis-függő BRET válasz alakult ki. Ez az interakció a hormon adását követően néhány perc alatt kialakult, és tartósan (legalább 90 percig) folyamatosan fennállt. A kettes típusú (AT2) angiotenzinreceptor elsősorban a plazmamembránon helyezkedik el, és irodalmi adatokból, valamint saját korábbi adatainkból ismert volt, hogy az AT1-receptortól eltérően angiotenzin II hatására nem aktivál Gq fehérjéket és nem internalizálódik. Létrehoztunk AT2-receptor/YFP fluoreszcens fehérjét is, és konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálatainkban azt találtuk, hogy ez a receptor angiotenzin II kezelést követően nem kapcsolódik β -arresztinnel. Ezt követően azt is kimutattuk, hogy nem jön létre detektálható BRET interakció AT2-receptor/YFP-t és β 2-arresztin/RL-t expresszáló kontroll, illetve angiotenzin II-vel serkentett sejtekben. Mindezek

alapján megállapítható, hogy az AT₁ és AT₂ receptorok eltérő jelátvitelük mellett jelentős eltéréseket mutatnak a β -arresztinekhez történő kapcsolódás szempontjából is. E kísérleteink eredményeit a FEBS Letters folyóiratban publikáltuk [Turu, G.; Szidonya, L.; Gáborik, Z.; Buday, L.; Spät, A.; Clark, A.J.L.; Hunyady, L.: Differential β -arrestin binding of AT₁ and AT₂ angiotensin receptors. *FEBS Letters* 580:41-45, (2006), IF: 3,37]. A pályázat kezdeti szakaszában a tudományterület legújabb eredményeiről felkérésre írt összefoglaló közleményeket is publikáltunk [Gáborik, Z.; Hunyady, L. *Trends Endocrinol. Metab.* 15:286-93, (2004), IF: 9,06; Hunyady, L.; Turu, G.: *Trends Endocrinol. Metab.* 15:405-8, (2004), IF: 9,06; Spät, A.; Hunyady, L.: *Physiol. Rev.* 84: 489-539, (2004), IF: 33,92].

Korábbi vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az internalizált AT₁-receptorok Rab4, Rab5 és Rab11 fehérjét tartalmazó endoszómális kompartmentekben jelennek meg. E kompartmentek vizsgálata céljából létrehoztuk e fehérjék YFP-hez, illetve RL-hoz kapcsolt fúziós fehérjeit. Konfokális mikroszkóppal megállapítottuk, hogy e fúziós fehérjék a sejtekben expresszálódnak, és sejten belüli elhelyezkedésük nem tér el jelentősen az eredeti Rab fehérjék intracelluláris lokalizációjától, valamint az internalizált AT₁-receptorokkal való kollokalizációjuk is megfigyelhető. Bár e kis G-fehérjék és az internalizált AT₁-receptorok között ko-lokalizáció volt megfigyelhető, BRET módszerrel nem tapasztaltunk detektálható interakciót. Ez a megfigyelésünk arra utalt, hogy az endoszómális kompartmentekben az AT₁-receptorok nincsenek molekuláris közelségben az adott vezikulára jellemző kis G-fehérjékkel. Ezért további vizsgálatainkban a receptorok heterotrimerikus G-fehérjékre kifejtett hatásának nyomon követésére alkalmas BRET módszert állítottunk be. Ennek érdekében létrehoztunk YFP-hez, illetve RL-hoz kapcsolt G-fehérje alegységeket, és megvizsgáltuk az AT₁-receptor aktiválásának hatását e G fehérje alegységek interakciójára. A mérés során azt használtuk ki, hogy a G-fehérje alfa, illetve béta-gamma alegységek között nyugalmi körülmények között BRET módszerrel kimutatható interakció a sejtek serkentésekor csökken, hiszen az aktivált G-fehérje alegységek szétváltnak. Elsőként Renilla luciferázhoz kapcsolt α_0 fehérje (α_0 -RL) és fokozott fluoreszcenciájú YFP-vel jelölt β_1 alegység (EYFP- β_1) interakcióját vizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy ha ezeket a fehérjéket CHO sejtekben ko-expresszáljuk AT₁-receptorral, akkor angiotenzin II hatását követően minimális mértékű BRET interakció változás mutatható csak ki angiotenzin II hatására. Ezzel szemben $G_{o/i}$ -fehérjéhez kapcsolt kannabinoid CB₁-receptort expresszáló CHO sejtekben agonista (WIN55,212-2) hatására jelentős BRET interakció csökkenés mérhető ki. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az AT₁-receptor kevésbé aktiválja a G_o -fehérjét CHO sejtekben, mint a CB₁-receptor. Ezt követően azt tapasztaltuk, hogy ha az AT₁ és a CB₁ receptorokat ko-expresszáljuk a sejtekben, akkor angiotenzin II hatására is létrejön a G-fehérje aktiváció. Kimutattuk, hogy az ilyen körülmények között létrejövő G-fehérje aktiválás gátolható AT₁ és CB₁ receptor gátlókkal, valamint diacilglicerín-lipáz gátlóval, mely az egyik legfontosabb

endokannabinoid vegyület, a 2-arachidonil-glicerol keletkezését gátolja. Ezek az adatok arra utalnak, hogy angiotenzin II hatására az AT₁-receptort tartalmazó membrán mikrodoménekben található lipidekből endokannabinoidok keletkeznek, melyek CB₁ receptorokat képesek aktiválni. Ezen eredményeinket a *J. Biol. Chem.* folyóiratban publikáltuk [Turu G; Simon A; Gyombolai P; Szidonya L; Bagdy G; Lenkei Z; Hunyady L: The role of diacylglycerol lipase in constitutive and angiotensin AT₁-receptor-stimulated cannabinoid CB₁ receptor activity. *J Biol Chem* **282**: 7753-7757 (2007), IF: 5.81].

2006-ban az angiotenzin II hatásmechanizmusával kapcsolatos legújabb eredményekről összefoglaló közleményt jelentettünk meg a *Mol. Endocrinol.* folyóiratban [Hunyady L; Catt KJ: Pleiotropic AT₁-receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II *Mol Endocrinol* **20**: 953-970 (2006), IF: 4.97]. A fentiek mellett nemzetközi együttműködésben modelt dolgoztunk ki az AT₁-receptor aktiválódásának mechanizmusára vonatkozóan, mely modell működését kísérletesen is ellenőriztük. A modelt és az ehhez kapcsolódó kísérletes eredményeket a *Chem. Biol. Drug Des.* folyóiratban publikáltuk [Nikiforovich GV; Zhang M; Yang Q; Jagadeesh G; Chen HC; Hunyady L; Marshall GR; Catt KJ: Interactions between conserved residues in transmembrane helices 2 and 7 during angiotensin AT₁-receptor activation *Chem Biol Drug Des* **68**: 239-49 (2006)]. Miután ez a folyóirat 2006-ban nevet változtatott (korábbi neve *J. Pept. Res.* volt), ezért ebben az évben még nem volt impakt faktora.

Az AT₁-receptor működését olyan sejtekben is vizsgálni kívántuk, melyek endogén módon is expresszálják a receptort. E sejtek esetében problémát jelent az általunk expresszált és az endogén receptorok elkülönítése. E probléma megoldására olyan AT₁-receptort hoztunk létre, mely nem köti az AT₁-receptor blokkoló candesartant, de egyéb működéseit tekintve megegyezik az eredeti receptorral. Számos mutáns AT₁-receptor vizsgálatát követően azt találtuk, hogy az S109Y mutációt tartalmazó receptor felel meg ezeknek a követelményeknek. Ez a receptor nem köt detektálható mértékben candesartant, de expressziós szintje, internalizációs kinetikája, inozitol-foszfát jel aktiváló képessége és β 2-arresztin kötése megegyezik az eredeti receptoréval. E receptort C9 sejtekben expresszálván igazoltuk, hogy ez a mutáns receptor azonos jelátviteli tulajdonságokkal rendelkezik az endogén receptorral, és az S109Y mutációt a G-fehérje aktiválásért felelős régió (Asp125 és Arg126) mutációjával kombinálva azt is kimutattuk, hogy C9 sejtekben létrejöhet angiotenzin II hatására G-fehérje aktiválástól független MAP-kináz aktiválódás. Kísérleteink eredményeit a *Biochem. Pharmacol.* folyóiratban publikáltuk [Szidonya L; Süpeki K; Karip E; Turu G; Várnai P; Clark AJL; Hunyady L: AT₁ receptor blocker-insensitive mutant AT_{1A} angiotensin receptors reveal the presence of G protein-independent signaling in C9 cells *Biochem Pharmacol* **73**: 1582-1592 (2007), IF 3.58].

A candesartan rezisztens AT₁-receptor szintén lehetőséget adott a receptordimerizáció funkcionális jelentőségének vizsgálatára. Amint azt felkérésre írt összefoglaló közleményünkben részletesen is kifejtettük, a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok dimerizációjának biofizikai és biokémiai módszerekkel történő vizsgálata számos nehézséget rejt magában, és a rendelkezésre álló módszerek alapján nem dönthető el egyértelműen, hogy e receptorok a sejtmembránban szabályos struktúrával rendelkező dimereket, illetve oligomereket alkotnak-e [Szidonya L; Cserző M; Hunyady L: Dimerization and oligomerization of G-protein-coupled receptors: Debated structures with established and emerging functions. *J Endocrinol* **196**: 435-454 (2008), IF: 3.07]. Ezzel szemben számos olyan funkcionális adat ismert, mely különböző receptorok esetében arra utal, hogy a receptorok között kialakuló kölcsönhatásoknak fontos funkcionális következményei lehetnek. Saját kísérleteinkben a dimerizált AT₁ receptorok kölcsönhatásának funkcionális következményeit vizsgáltuk. Ennek érdekében a sejtekben olyan AT₁ receptorokat expresszáltunk, melyek nem képesek G-fehérjét aktiválni (DRY/AAY), míg más sejtekben candesartant nem kötő (S109Y) receptorokat expresszáltunk. Amint várható volt a candesartan ezekben a sejtekben nem befolyásolta az inozitol-foszfát választ, hiszen az egyik sejtben található receptor nem képes candesartant kötni (S109Y), míg a másik sejtben nem jött létre angiotenzin II hatására inozitol-foszfát válasz (DRY/AAY). Ha a két receptor ko-expresszáltuk, akkor az angiotenzin II-re adott inozitol-foszfát választ a candesartan szignifikánsan csökkentette, ami arra utal, hogy az egyik molekula (S109Y) által létrehozott inozitol-foszfát választ a másik molekulához (DRY/AAY) kötődő candesartan képes gátolni. Ez az eredményünk összhangban van a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok aktiválódásának azon modelljével, mely szerint a receptorok dimerjei alkotnak funkcionális egységet, és kötődnek a heterotrimerikus G-fehérjékhez. Vizsgálataink eredményeit a *Neurochem. Int.* folyóiratban publikáltuk [Karip E; Turu G; Süpeki K; Szidonya L; Hunyady L: Cross-inhibition of angiotensin AT₁ receptors supports the concept of receptor oligomerization. *Neurochem Int* **51**: 261-267 (2007), IF: 3.16].

A renin-angiotenzin rendszer a só-vízháztartásban és a keringésszabályozásban játszott fontos élettani szerepe mellett kórélettani és terápiás szempontból is kiemelkedő jelentőségű szabályozó rendszer. Hipertóniában és más keringési betegségekben elterjedten használt gyógyszerek az angiotenzin II képződését gátló konvertáló enzimbénítők. A konvertáló enzim bénítása azonban egyéb peptidek (pl. kininek) anyagcseréjét is befolyásolja. Az ebből adódó mellékhatások kiküszöbölése szempontjából új fejezetet jelentett az AT₁-receptor antagonisták (pl. losartan) megjelenése és elterjedése a terápiás gyakorlatban. Eredményeink felvetik annak lehetőségét, hogy az AT₁-receptor aktivációjának gátlásának következményeként más receptorok működésében is alapvető változások jöhetnek létre. Már eddig is ismert volt, hogy ilyen körülmények között a szervezetben megemelkedő angiotenzin II szint aktiválhatja az AT₂-receptorokat.

Eredményeink arra utalnak, hogy ez az aktiváció tartós következményekkel járhat, hiszen az AT₂-receptorok nem képesek kötni a G-fehérjéhez kapcsolt receptorok deszenzitizációjában alapvető szerepet játszó β -arresztin fehérjét. Ezen túlmenően az általunk felismert mechanizmussal az AT₁ receptorok gátlása a kannabinoid receptorok aktivitását is csökkentheti, és ezzel mellékhatásokat hozhat létre. További fontos megfigyelésünk ebből a szempontból, hogy a dimerizált AT₁-receptorok képesek egymás működését befolyásolni. Ez különösen fontos lehet a heterodimerizált receptorok esetében, hiszen ezek egymás aktivitását csökkenthetik, és azokban a szövetekben, ahol az AT₁ receptor nagy mennyiségben van jelen, ott annak gátlása a vele dimerizációs kapcsolatban lévő egyéb receptorok aktivitását is csökkentheti. Tekintettel arra, hogy a renin-angiotenzin rendszer AT₁-receptorokon keresztül létrehozott hatásai fontos szerepet játszanak számos kórfolyamat terápiájában, e mechanizmusok pontos megismerése fontos támpontot jelenthet a terápiás beavatkozások továbbfejlesztése szempontjából.